

MAPK 相互作用蛋白激酶 1 对心肌细胞炎症的作用

袁 园 车 妍 王兆鹏 靳亚阁 唐其柱

摘 要 **目的** 于在体水平和离体水平研究 MAPK 相互作用蛋白激酶 1 对心肌细胞炎症的作用。**方法** 应用 MAPK 相互作用蛋白激酶 1 基因敲除小鼠和 C57 BL/6 野生型小鼠,行主动脉缩窄术,于术后 4 周取材。应用免疫荧光染色,检测心肌组织中 P - NF - κ Bp65 在心肌细胞中的核转位。应用 Western blot 法检测心肌组织中 P - NF - κ Bp65 和 TNF - α 。应用 Mnk1 shRNA 腺病毒转染技术,降低 H9c2 细胞中 Mnk1 的表达,给予血管紧张素 II 刺激 48h。应用免疫荧光染色,检测 H9c2 细胞中 P - NF - κ Bp65 的核转位。应用 RT - PCR 检测 H9c2 细胞中 TNF - α mRNA 的表达。**结果** 在体实验表明,主动脉缩窄术后 4 周,与野生型小鼠相比,MAPK 相互作用蛋白激酶 1 基因敲除小鼠心肌组织中 P - NF - κ Bp65 在心肌细胞中的核转位明显增多,TNF - α 和 P - NF - κ Bp65 的蛋白表达明显增加。离体实验表明,MAPK 相互作用蛋白激酶 1 表达降低的 H9c2 细胞中 P - NF - κ Bp65 的核转位明显增多,TNF - α mRNA 的表达明显增加。**结论** MAPK 相互作用蛋白激酶 1 基因缺失促进压力负荷诱导的小鼠心肌组织炎症,其表达降低可促进血管紧张素 II 诱导的心肌细胞炎症。

关键词 MAPK 相互作用蛋白激酶 1 炎症 心肌细胞

中图分类号 R542.2;R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.03.016

Effect of MAP Kinase - interacting Kinase 1 on Myocardial Inflammation. Yuan Yuan, Che Yan, Wang Zhaopeng, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of MAP kinase - interacting kinase 1 (Mnk1) on myocardial inflammation. **Methods** Using Mnk1 gene knockout mice and C57 BL/6 wild type mice, we investigated the nuclear localization of NF - κ Bp65 and the protein levels of P - NF - κ Bp65 and TNF - α in heart tissue after 4 weeks of aortic banding by immunofluorescence and Western blot respectively. For the in vitro studies, the expression of Mnk1 in H9c2 cells was knocked down using adenovirus expressing Mnk1 shRNA. And the cells (control group and Mnk1 shRNA group) were stimulated with angiotensin II for 48 hours. The nuclear localization of NF - κ Bp65 and the mRNA level of TNF - α was analyzed by immunofluorescence and RT - PCR respectively. **Results** The in vivo studies showed that P - NF - κ Bp65 nuclear translocation significantly increased in the heart tissue of Mnk1 gene knockout mice as compared with C57 BL/6 wild type mice. Furthermore, the protein levels of P - NF - κ Bp65 and TNF α increased as mediated by pressure overload, especially in the Mnk1 gene knockout mice. The in vitro studies indicated that decreased Mnk1 expression increased P - NF - κ Bp65 nuclear translocation and TNF - α mRNA expression in angiotensin II - stimulated H9c2 cells. **Conclusion** Mnk1 gene knockout accelerate pressure overload - induced II myocardial inflammation, decreased Mnk1 expression led to more aggressive cardiomyocyte inflammation induced by angiotensin.

Key words MAP kinase - interacting kinase 1; Inflammation; Cardiomyocytes

MAPK 相互作用蛋白激酶 1 (MAP kinase - interacting kinase 1, Mnk1) 在研究细菌经典 MAPKs 调节蛋白表达文库时被发现^[1]。Mnk1 可调节多个底物磷酸化,如真核细胞翻译起始因子(eukaryotic translation initiation factor, eIF4E)和 sprouty2。sprouty2 可以通过与生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor recep-

tor bound protein 2, GRB2) 结合抑制 Ras/ERK 信号通路^[2,3]。还有研究者发现, eIF4E 可通过促进 Bcl - 2 的表达来发挥抗凋亡效应。不论是 sprouty2 还是 eIF4E 均可被 Mnk1 磷酸化,受 Mnk1 调节。Mnk1 磷酸化 sprouty2 可以保护 sprouty2 的稳定性,避免其与 c - Cbl 结合从而发生降解^[4]。而 Mnk1 磷酸化 eIF4E 则是通过这种途径来促进 eIF4F 翻译起始复合物的形成,促进某些 mRNA 如 TNF - α 在核糖体的聚集招募^[5]。近年来研究显示, Mnk1 与多种肿瘤的发生、发展呈密切相关^[6,7]。本项目组已发表的研究证实, Mnk1 基因敲除后,心肌细胞中 sprouty2 降解增多,对

基金项目:湖北省医学领军人才培养工程专项基金资助项目;中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(2042016k0119)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科、武汉大学心血管病研究所,心血管病湖北省重点实验室

通讯作者:唐其柱,电子邮箱: qztang@whu.edu.cn

ERK1/2 信号通路的抑制作用减弱,导致 ERK1/2 信号通路激活和压力负荷诱导的心肌重构程度加剧^[8]。在本研究中,应用 MAPK 相互作用蛋白激酶 1 基因敲除小鼠和 C57 BL/6 野生型小鼠,建立主动脉缩窄术诱导的心肌肥厚模型,于在体水平研究 Mnk1 对压力负荷诱导的慢性心肌炎症的作用。应用 Mnk1 shRNA 腺病毒转染技术,降低 H9c2 细胞中 Mnk1 的表达,建立血管紧张素 II 刺激诱导的心肌细胞肥大模型,于离体水平研究 Mnk1 对血管紧张素 II 诱导的心肌细胞炎症的作用。为进一步揭示 Mnk1 在心脏中的作用提供实验基础。

材料与方法

1. 实验材料:H9c2 细胞株购自中国科学院上海声明科学研究院细胞资源中心。DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司)。Mnk1 shRNA 腺病毒为汉恒生物科技(上海)有限公司构建。TNF- α 和 GAPDH 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。蛋白定量 BCA 试剂盒(美国 Thermo scientific 公司)。P-NF- κ Bp65、NF- κ Bp65、TNF- α 、GAPDH 抗体(美国 CST 公司)。Triton X100(美国 Amresco 公司)。羊血清(美国 Abcam 公司)。羊抗兔荧光二抗(美国 Invitrogen 公司)。

2. 实验方法:(1)心肌组织 P-NF- κ Bp65 核转位染色:心肌组织切片于 55℃ 烘箱处理 30min,防脱片。二甲苯 5min $\times$ 3 次,100% 乙醇 5min $\times$ 2 次,95% 乙醇 5min,70% 乙醇 5min。ddH₂O 漂洗 5min $\times$ 2 次。高压抗原修复:取适量的柠檬酸盐抗原修复液 2。(pH6.0),利用高压锅进行抗原修复。切片置于冰上冷却。ddH₂O 漂洗 5min $\times$ 2 次,PBS 漂洗 5min $\times$ 2 次。3% H₂O₂ 溶液室温孵育 20min,ddH₂O 漂洗 5min $\times$ 2 次,PBS 漂洗 5min $\times$ 2 次。8% 羊血清室温封闭 60min。弃去封闭液,P-NF- κ Bp65 抗体(1:100 稀释)湿盒 37℃ 孵育 2h。弃一抗,PBS 洗 5min $\times$ 3 次。羊抗兔荧光二抗(1:200 稀释)37℃ 孵育 60min。弃二抗,PBS 洗 5min $\times$ 4 次。DAPI 封片。荧光显微镜下观察。(2)Western blot 法检测:研磨组织或裂解细胞,离心去取上清。按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量操作。使用分光光度计测出蛋白浓度,校正所有蛋白样品终浓度为适宜浓度,浓度过低样本弃用。加热变性保存。制胶、电泳、转膜、封闭、TBST 洗膜、一抗 4℃ 孵育过夜、TBST 洗膜、荧光二抗室温孵育 1h、TBST 洗膜,双通道荧光扫描仪扫描,分析结果。(3)心肌细胞 P-NF- κ Bp65 核转位染色:细胞

以 1×10^5 个/毫升的浓度种于爬片上,应用 Mnk1 shRNA 腺病毒或者对照 shRNA 腺病毒(100MOI)进行转染 2h,更换无血清培养基,饥饿 12h 后,给予血管紧张素 II ($1 \mu\text{mol/L}$) 刺激 48h。固定:甲醇:乙酸(95:5)于 20℃ 放置 20min。通透:0.3% Triton X100 于 4℃ 放置 5min。8% 羊血清室温封闭 60min,P-NF- κ Bp65 抗体(1:100 稀释)湿盒 37℃ 孵育 2h,羊抗兔荧光二抗(1:200 稀释)37℃ 孵育 40min。DAPI 封片。荧光显微镜下观察。(4)RT-PCR:使用 Trizol 液收集细胞。三氯甲烷抽提:各管分别加入 200 μl 三氯甲烷,用力摇匀,室温放置 5min。12000 $\times g$ 转速,4℃ 离心 15min。混合液分为 3 层:下层为粉红色的有机相 DNA,中间为白色薄层蛋白质,上层为清亮的水相 RNA。RNA 沉淀:小心将上层水相转移到新的 EP 管中,约 300~400 μl 。加入等体积异丙醇,上下颠倒混匀,室温放置 10min。12000 $\times g$ 4℃ 离心 10min。RNA 沉淀的漂洗:离心后可观察到白色絮状沉淀位于管底,为总 RNA,将上清吸出弃去,加入 1ml 75% 乙醇,稍振荡使 RNA 沉淀重悬漂洗。7500 $\times g$ 4℃ 离心 5min。弃上清,用 1 次性 PE 膜手套盖住管口,室温干燥 10min。用 11.2 μl DEPC 水溶解 RNA,55℃ 烘箱 10min,以促进 RNA 的溶解。分光光度法检测 RNA 纯度及浓度:使用 NanoDrop 2000 仪器,以 1.2 μl 纯水作为空白对照。各样本依次取 1.2 μl ,测量 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 和 RNA 浓度。配好反转录反应体系(13 μl),放入 PCR 仪,设置以下程序:70℃,10min。程序结束后立即取出反应管置于冰上至少 5min。每个反应管中加入以下试剂:RT-buffer 4 μl 、dNTP 2 μl 、RTase 0.5 μl 、inhibitor 0.5 μl ,总体积 7 μl ,放入 PCR 仪,设置程序:25℃ 10min,50℃ 60min,90℃ 5min,4℃ 5min,进行反转录后,每管中加入 60 μl PCR 级水稀释,混匀,点入 96 孔板,用薄膜密封后放入水平离心机中,3000r/min 4℃ 离心 2min 后,置于 PCR 仪检测分析。

3. 统计学方法:使用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SD$)表示,多组资料比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 T 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 免疫荧光染色结果:与假手术(sham surgery, Sham)组相比,对应主动脉缩窄术(aortic banding, AB)组心肌组织中 NF- κ Bp65 核转位阳性细胞数显著增多;AB 术后 4 周,Mnk1 基因敲除小鼠(gene

knockout, KO) 较 C57 BL/6 野生型小鼠 (wild type, WT) 心肌组织中 NF- κ Bp65 核转位阳性细胞数显著

增多(图 1)。

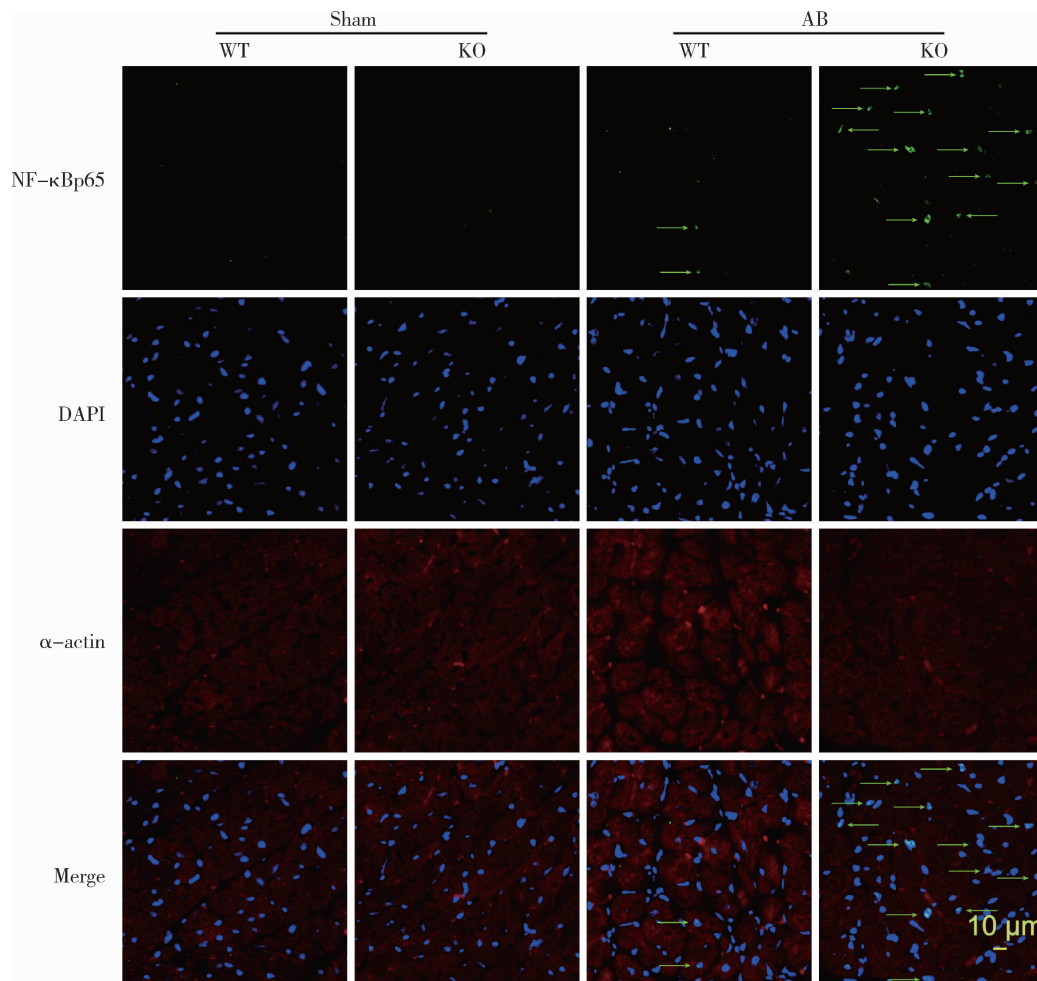


图 1 心肌组织 NF- κ Bp65 核转位免疫荧光染色

2. Western blot 法检测结果:与 Sham 组比较,对应 AB 组心肌组织中 TNF- α 和 P-NF- κ Bp65 的蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$, 图 2);AB 术后 4 周,与

WT 小鼠比较,Mnk1 KO 小鼠心肌组织中 TNF- α 和 P-NF- κ Bp65 的蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$, 图 2)。

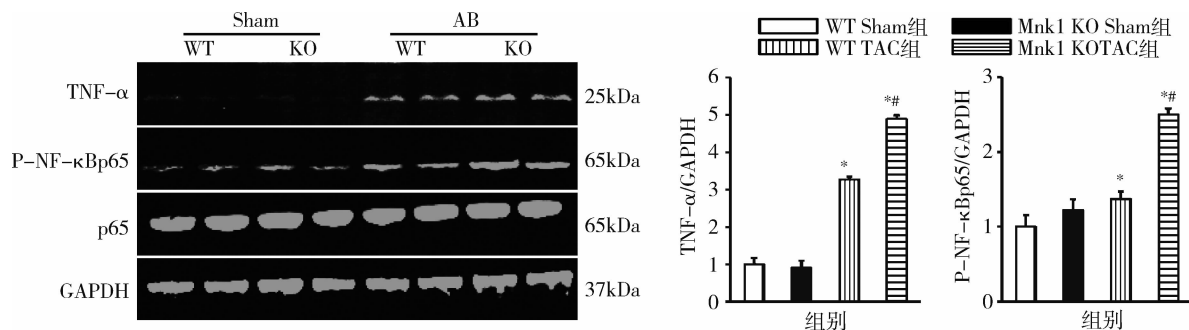


图 2 Western blot 法检测心肌组织 TNF- α 和 P-NF- κ Bp65 蛋白表达水平

与 WT Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 WT AB 组比较, # $P < 0.05$

3. 心肌细胞炎症评价: H9c2 细胞转染 Mnk1

shRNA 后, Mnk1 mRNA 的表达显著减少 ($P < 0.05$,

图 3A);血管紧张素 II 刺激 48h 后,与对照组 (CON + Ang II) 比较, Mnk1 shRNA 腺病毒转染组 (Mnk1 shRNA + Ang II) H9c2 细胞中, NF - κBp65 核转位阳

性细胞数显著增多 (图 3B), TNF - α mRNA 的表达显著增加 (图 3C, $P < 0.05$)。

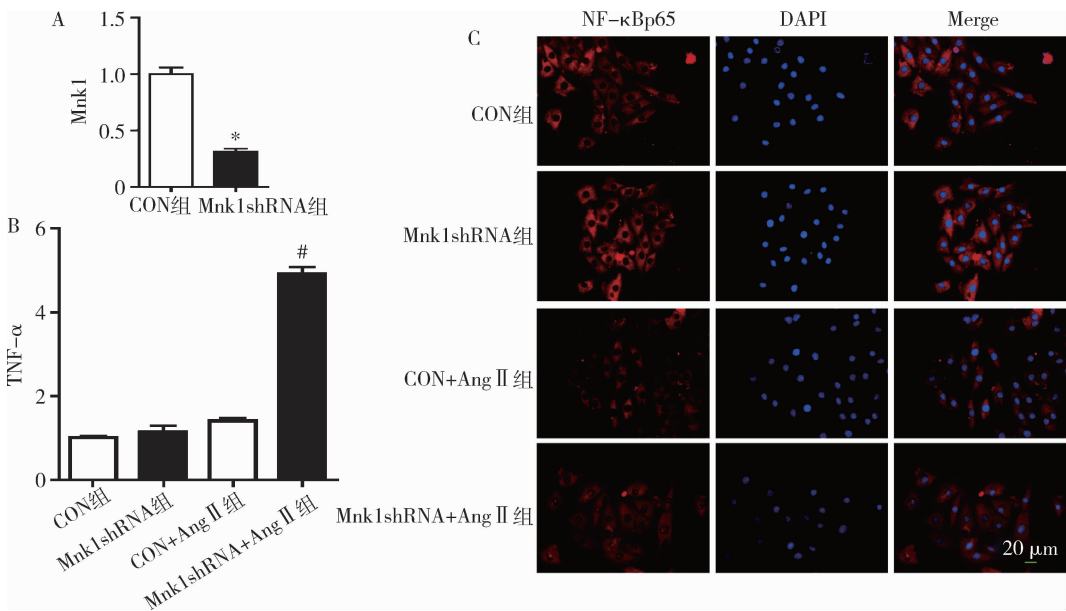


图 3 心肌细胞炎症的评价

与 CON 组比较, * $P < 0.05$; 与 CON + Ang II 组比较, # $P < 0.05$

讨 论

本研究发现,主动脉缩窄术后 4 周,与野生型小鼠相比,Mnk1 基因敲除小鼠心肌组织中 P - NF - κBp65 在心肌细胞中的核转位明显增多, TNF - α 和 P - NF - κBp65 的蛋白表达明显增加。Mnk1 表达降低的 H9c2 细胞中 P - NF - κBp65 的核转位明显增多, TNF - α mRNA 的表达明显增加。这表明 Mnk1 基因缺失促进压力负荷诱导的小鼠心肌组织炎症,其表达降低可促进血管紧张素 II 诱导的心肌细胞炎症。

小鼠原代心肌细胞培养获取细胞数量较少,促进了大鼠心肌细胞培养在心血管病领域的广泛应用。大鼠心肌细胞培养为细胞水平的研究进行横向比较提供了便利^[9]。H9c2 细胞是来源于胚胎期 BD1X 大鼠心脏组织的亚克隆细胞系,在心肌疾病研究领域有较为广泛的应用。该细胞系与原代心肌细胞相比,培养简便,可传代且成活率高,故本研究使用了 H9c2 细胞在离体水平探索 Mnk1 对心肌细胞炎症的影响。

目前发现的 Mnk1 的底物,除了 eIF4E 和 sprouty2,还包括有翻译复合物的成分 (eIF4G)、核不均一性 RNA 结合蛋白 (the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, hnRNP A1) 和多聚嘧啶结合蛋白相关剪切因子 (the polypyrimidine tract - binding protein

associated splicing factor, PSF) 以及胞质磷脂酶 A2 (cytoplasmic phospholipase A2, cPLA2)。Mnk1 的 3 个底物 (hnRNP A1、PSF 和 cPLA2) 与 TNF - α 关系密切。在渗透性应激作用下,通过 p38MAPK 信号通路, hnRNP A1 高度磷酸化在胞质聚集,结合多聚 A 尾 mRNA,促进 TNF - α 翻译。但 T 细胞活化情况下, Mnk1 磷酸化的 hnRNP A1 并没有促进其在胞质内聚集,从而使其与 TNF - α mRNA 的结合减少, TNF - α 翻译减少。Mnk1 还可通过磷酸化 hnRNP A1 而调节 TNF - α 的翻译 TNF - α 的 3' 端非翻译区域的富含 AU 区域可以结合 hnRNP A1^[5]。活体内, Mnk1 介导的 PSF 的磷酸化可以增加其与 TNF - α mRNA 的结合。对于富含 AREs 的 mRNA 包括 TNF - α,如编码细胞因子,即时早期基因蛋白以及其他的参与炎症的蛋白的 mRNA, Mnk1 可以调节 PSF/p54nrb 与此类 mRNA 的结合^[10]。目前对于 Mnk1 和炎症的相关研究不多, Mnk1 可否通过调节炎症参与疾病发生、发展,其在不同的器官、组织和细胞中的作用是否不同,尚待阐明。

综上所述,炎症参与众多心血管疾病的起始、进展和修复过程。心肌组织炎症可发生于心内膜炎、心肌梗死、心肌炎、结节性心肌病、心肌淀粉样变性等疾

病过程^[11]。在心肌肥厚这一众多心血管疾病的共同病理生理过程中,炎症的角色并未完全阐明。目前的研究显示,促炎因子 TNF - α 可促进心肌肥厚^[12]。心肌细胞 TNF - α 在心肌炎症过程中表达上升^[13, 14]。本研究显示,在压力负荷条件下,Mnk1 基因敲除小鼠心肌组织中 TNF - α 和 P - NF - κ Bp65 的表达均较 WT 组有明显上调。离体实验印证,Mnk1 表达降低的 H9c2 细胞中 P - NF - κ Bp65 的核转位明显增多,TNF - α mRNA 的表达明显增加。已发表的研究显示,Mnk1 基因敲除后,心肌细胞中 sprouty2 降解增多,对 ERK1/2 信号通路的抑制作用减弱,导致 ERK1/2 信号通路激活和压力负荷诱导的心肌重构程度加剧^[8]。在心肌细胞中,抑制 ERK1/2 磷酸化可以使 TNF - α 的表达减少。这提示在压力负荷条件下,Mnk1 基因敲除可能通过心肌组织中 ERK1/2 的磷酸化水平增强,最终导致 TNF - α 表达增多,从而参与压力负荷下心肌的慢性炎症过程。然而特异性激活 Mnk1,反向论证其是否对心肌细胞炎症有确切作用,Mnk1 对 TNF - α 以及心肌炎症的影响是否与 Mnk1 的 3 个底物 (hnRNPA1、PSF 和 cPLA2) 有关系,有待于进一步研究。

参考文献

- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, *et al.* Mitogen - activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2 [J]. *EMBO J*, 1997, 16(8): 1909 - 1920
- Joshi S, Platanias LC. Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes [J]. *World J Biol Chem*, 2014, 5(3): 321 - 333
- Yim DG, Ghosh S, Guy GR, *et al.* Casein kinase 1 regulates Sprouty2 in FGF - ERK signaling [J]. *Oncogene*, 2015, 34(4): 474 - 484
- Dasilva J, Xu L, Kim HJ, *et al.* Regulation of sprouty stability by Mnk1 - dependent phosphorylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(5): 1898 - 1907

- Buxade M, Parra JL, Rousseau S, *et al.* The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1 [J]. *Immunity*, 2005, 23(2): 177 - 189
- Fan W, Wang W, Mao X, *et al.* Elevated levels of p - Mnk1, p - eIF4E and p - p70S6K proteins are associated with tumor recurrence and poor prognosis in astrocytomas [J]. *J Neurooncol*, 2017, 131(3): 485 - 493
- Liu Z, Li Y, Lv C, *et al.* Anthelmintic drug niclosamide enhances the sensitivity of chronic myeloid leukemia cells to dasatinib through inhibiting Erk/Mnk1/eIF4E pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 893 - 899
- Yuan Y, Yan L, Wu Q Q, *et al.* Mnk1 (mitogen - activated protein kinase - interacting kinase 1) deficiency aggravates cardiac remodeling in mice [J]. *Hypertension*, 2016, 68(6): 1393 - 1399
- Parameswaran S, Kumar S, Verma RS, *et al.* Cardiomyocyte culture - an update on the in vitro cardiovascular model and future challenges [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013, 91(12): 985 - 998
- Buxade M, Morrice N, Krebs D L, *et al.* The PSF. p54nrb complex is a novel Mnk substrate that binds the mRNA for tumor necrosis factor alpha [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(1): 57 - 65
- Kircher M, Lapa C. Novel noninvasive nuclear medicine imaging techniques for cardiac inflammation [J]. *Curr Cardiovasc Imaging Rep*, 2017, 10(2): 6
- Tang F, Lu M, Yu L, *et al.* Inhibition of TNF - alpha - mediated NF - kappaB activation by ginsenoside Rg1 contributes the attenuation of cardiac hypertrophy induced by abdominal aorta coarctation [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2016, 68(4): 257 - 264
- Wei SG, Yu Y, Weiss RM, *et al.* Inhibition of brain mitogen - Activated protein kinase signaling reduces central endoplasmic reticulum stress and inflammation and sympathetic nerve activity in heart failure rats [J]. *Hypertension*, 2016, 67(1): 229 - 236
- Song XA, Jia LL, Cui W, *et al.* Inhibition of TNF - alpha in hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by inhibiting neurohormonal excitation in spontaneously hypertensive rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 281(1): 101 - 108

(收稿日期:2017 - 06 - 14)

(修回日期:2017 - 06 - 20)

(上接第 23 页)

- Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, *et al.* Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(7): 772 - 777
- VanDer Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, *et al.* Platelet - and erythrocyte - derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(7): 1355 - 1362
- Spronk HM, ten CH, van der Meijden PE. Differential roles of tissue factor and phosphatidylserine in activation of coagulation [J]. *Thromb Res*, 2014, 133: S54 - S56
- Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Extracellular vesicles and atherosclerotic disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(14): 2697 - 2708

- Kent MW, Kelher MR, West FB, *et al.* The pro - inflammatory potential of microparticles in red blood cell units [J]. *Transfus Med*, 2014, 24(3): 176 - 181
- Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, *et al.* Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease [J]. *Blood*, 2015, 125(24): 3805 - 3814
- Liu Y, He Z, Zhang Y, *et al.* Dissimilarity of increased phosphatidylserine posualtion activation in acute coronary syndromes [J]. *Coron Artery Dis*, 2016, 27(5): 365 - 375
- Giannopoulos G, Oudatzis G. Red blood cell and platelet microparticles in myocardial infarction patients treated with primary angioplasty [J]. *International J Cardiol*, 2014, 176(1): 145 - 150

(收稿日期:2017 - 10 - 23)

(修回日期:2017 - 11 - 02)